مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

تولید گونه‌ی تراریخت *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* واجد ژن cas2 و بررسی افزایش تولید پادزیست در آن با روش بیواسی

زهره حجتی[۱]، صدیقه گیوی[۱]، مریم کی[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۲/۰۲/۱۸

پذیرش:۱۳۹۲/۷/۱۴

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۲/۲۰

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM 1392; 7(4): P 30-35

نویسنده مسئول:

دکتر زهره حجتی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تلفن: ۰۹۱۳۳۲۸۷۹۰۳

پست الکترونیک:

z.hojati@sci.ui.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* تولیدکننده‌ی پادزیست کلاولانیک اسید است که به‌طور گسترده‌ای همراه با سایر پادزیست‌های قوی و حساس به بتالاکتاماز استفاده می‌گردد. ژن cas2 در دسته ژنی کلاولانیک اسید قرارگرفته و در تنظیم بیوسنتز کلاولانیک اسید نقش دارد.

مواد و روش کار: سازه (کانسترکت) نوترکیب pMTcas2 حاوی ژن *cas2* از دانشگاه اصفهان تهیه گردید. با استفاده از روش لیز قلیایی پلاسمید نوترکیب از سویه‌ی *استرپتومایسس لیویدنس* استخراج گردید. کانسترکت نوترکیب با استفاده از روش پلی‌اتیلن گلیکول به پروتوپلاست‌های تهیه‌شده از باکتری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* ترانسفورم گردید. به‌منظور تأیید ترانسفورماسیون از روش‌های استخراج پلاسمید و PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی *cas2* استفاده شد. درنهایت به‌منظور بررسی نحوه‌ی تأثیر ژن *cas2* اضافه‌شده در تولید پادزیست از روش بیواسی استفاده گردید.

یافته‌ها: ساختار پلاسمید نوترکیب پس از استخراج با روش هضم آنزیمی تأیید شد. پس از ترانسفورماسیون کلنی‌های تک بر روی محیط بازیابی پروتوپلاست حاوی پادزیست اسپورهای خاکستری‌رنگ بر روی آن شکل گرفت. استخراج پلاسمید از سویه‌ی ترانسفورم شده انجام‌شده و ترانسفورماسیون با انجام *PCR* تأیید گردید. مطالعات بیواسی نشان داد که حضور پلاسمید نوترکیب سبب افزایش ٤/١ برابری تولید کلاولانیک اسید در سویه‌ی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* گردیده است.

نتیجه‌گیری: با انجام روش بایواسی و تجزیه‌وتحلیل یافته‌ها مشخص شد که حضور پلاسمید نوترکیب واجد ژن *cas2* سبب افزایش تولید کلاولانیک اسید در سویه‌ی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* گردیده است. افزایش تولید کلاولانیک اسید می‌تواند گامی مؤثر در روند کاهش هزینه‌های تولید داروهای پرمصرف وابسته به آن گردد.

کلمات کلیدی : *استرپتومایسس کلاولی‌جروس*، کلاولانیک اسید، بیواسی، پلاسمید pMTcas2، ژن cas2

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

استرپتومایسس‌ها از مهم‌ترین اعضای اکتینومیست‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و رشته‌ای هستند که در پاسخ به عوامل محیطی متحمل تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی می‌شوند. این دسته از باکتری‌ها با تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی، بسیاری از ترکیبات ازجمله قندها، الکل‌ها، اسیدهای آمینه و ترکیبات آروماتیک را متابولیزه می‌نمایند (۱). استرپتومایسس‌ها دارای کروموزوم خطی بزرگی بوده که در میان باکتری‌ها ساختار ژنتیکی غیرمعمولی می‌باشد. نیمه‌ی مرکزی کروموزوم تقریباً شامل همه ژن‌های مورد نیاز برای رشد، تقسیم سلولی، همانندسازی، رونویسی و بیوسنتز اسیدهای آمینه می‌باشد. دسته‌ای دیگر از ژن‌ها که از اهمیت فراوان برخوردار بوده ژن‌های تولیدکننده‌ی آنتی‌بیوتیک (پادزیست) می‌باشند (۲ و ۳). گونه‌ی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* تولیدکننده‌ی تعدادی از ترکیبات بتالاکتام از قبیل پنی‌سیلین N و کلاولانیک

اسید می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام کاربرد بالینی وسیعی داشته به‌طوری‌که به‌منظور درمان انواع آلودگی‌های باکتریایی مورداستفاده قرار می‌گیرند، ازاین‌رو ازلحاظ اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشند (۴). این پادزیست‌ها مهارکننده‌ی قوی سنتز دیواره‌ی سلولی بوده و لذا تنها برای سلول‌های در حال رشد، کشنده می‌باشند. کلاولانیک اسید ازجمله پادزیست‌های بسیار پرکاربرد در کلینیک بوده که نخستین بار توسط براون (Brown) و همکارانش به‌عنوان محصول باکتری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* شناسایی گردید. پادزیست کلاولانیک اسید خود به‌تنهایی فعالیت ضد باکتری ضعیفی داشته، ولی به دلیل عملکرد قوی آن در مهار آنزیم‌های بتالاکتاماز همراه سایر پادزیست‌های قوی و حساس به بتالاکتاماز مورداستفاده قرار می‌گیرد. ترکیب کلاولانیک اسید با بسیاری از پادزیست‌ها محصولات تجاری مختلفی ازجمله اگمنتین و تیمنتین را روانه‌ی بازار نموده است (۵، ۶ و ۷). مطالعات نشان داده که ۲۳ ژن مختلف در مسیر سنتز کلاولانیک اسید نقش داشته و نقش سنتز و تنظیم تولید کلاولانیک اسید را بر عهده‌دارند (۸). ژن cas2 یکی از ژن‌های بیوسنتز کلاولانیک اسید بوده که از ۹۷۸ جفت‌باز تشکیل‌شده است. این ژن تولیدکننده‌ی آنزیم کلاوامینات سنتتاز بوده که در مسیر بیوسنتز پروکلاوامینیک اسید را به کلاوامینیک اسید تبدیل می‌نماید. درنتیجه این آنزیم در تشکیل حلقه‌ی دوم کلاوام‌ها نقش دارد. با افزایش دانش و اطلاعات از مسیر بیوسنتز پادزیست‌ها و دسته‌های ژنی مربوط به آن‌ها در سویه‌های مولد، روش‌های مهندسی ژنتیک به‌منظور سنتز سویه‌های بهبودیافته به‌صورت هدفمند مورداستفاده قرار می‌گیرد (۹، ۱۰). اطلاعات موجود از مسیر بیوسنتز کلاولانیک اسید با مطالعات انجام‌شده بر روی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* به‌طور گسترده افزایش‌یافته است. این اطلاعات به‌منظور دست‌کاری ژنتیکی مسیر بیوسنتز و افزایش تولید پادزیست کلاولانیک اسید مورداستفاده قرار می‌گیرد. روش‌های مختلفی جهت ورود DNA خارجی به استرپتومایسس‌ها وجود داشته که از آن جمله می‌توان به ترانسفورماسیون به‌واسطه‌ی پلاسمید اشاره نمود (۱۱). کارایی ترانسفورماسیون را می‌توان با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول به‌شدت افزایش داد. تحقیقات نشان داده که این مولکول موجب الحاق غشاهای سلولی به‌منظور انتقال DNA خارجی به درون سلول گردیده و از این طریق انتقال را تسهیل می‌نماید (۱۲). با توجه به اهمیت و کاربرد وسیع کلاولانیک اسید در کلینیک در این تحقیق بر آن شدیم تا با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک تولید و ساخت سازه‌ی ژنی حاوی ژن cas2 تولید آن را افزایش دهیم. در ادامه سازه مذکور به‌منظور ترانسفورماسیون از سویه‌ی حد واسط *استرپتومایسس لیویدنس* استخراج شد. ترانسفورماسیون به سویه‌ی اصلی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* به‌واسطه‌ی پلی‌اتیلن‌گلایکول صورت پذیرفته و پس‌ازآن میزان تأثیر حضور ژن cas2 در افزایش تولید پادزیست با استفاده از روش باواسی موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

تهیه‌ی سازه‌ی نوترکیب: پلاسمید pMT3206 حاوی ژن cas2 کلون شده در دانشگاه اصفهان تهیه گردید. این پلاسمید در سویه‌ی باکتری *استرپتومایسس لیویدنس* ترانسفورم گردیده تا بتوان برای ترانسفورماسیون در *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* استفاده نمود. این سازه یک ناقل بیانی ویژه استرپتومایسس است که از یک پروموتر القایی قوی GylP1/P2 و همچنین رپرسور آن تشکیل‌شده است. به‌منظور استفاده، پلاسمید موردنظر از باکتری *استرپتومایسس لیویدنس* استخراج‌شده و مورداستفاده قرار گرفت.

هضم آنزیمی: به‌منظور تأیید حضور ژن cas2 در ساختار وکتور نوترکیب هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدود الاثر BamH1 و XbaI صورت پذیرفت. به‌منظور انجام هضم آنزیمی دوگانه باید به نوع بافر و دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم‌ها توجه نمود. واکنش هضم آنزیمی دوگانه با بافر مشترک 2X Tango™ انجام شد. دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم‌های BamH1 و XbaI، ۳۷ درجه سلسیوس می‌باشد.

تهیه‌ی پروتوپلاست: به‌منظور تهیه‌ی پروتوپلاست از روشی که توسط اوکانیشی (Okanishi) و همکارانش در سال ۱۹۷۴ ارائه گردید استفاده شد. بدین منظور ۱ سی‌سی از اسپور استرپتومایسس درون محیط YEMEG کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت رشد ساکارز ۱۰/۳٪ به باکتری‌ها اضافه گردیده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ انجام شد. مرحله‌ی شستشوی باکتری‌ها با ساکارز ۱۰/۳ درصد دو بار تکرار گردید. به رسوب حاصله ۴ میلی‌لیتر محلول لیزوزیم اضافه‌شده و در حمام بن‌ماری ۳۰ درجه سلسیوسی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. پس‌ازاین مدت ۵ میلی‌لیتر بافر P به محلول اضافه کرده و برای ۱۵ دقیقه‌ی دیگر در شرایط قبل انکوبه شد. پروتوپلاست‌ها با استفاده از فیلتر کتانی، فیلتر شده و به مدت ۷ دقیقه در ۳۰۰۰

rpm سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله به‌آرامی در ۱ میلی‌لیتر بافر P حل‌شده و مجدد سانتریفوژ گردید. در آخر رسوب در ۵ میلی‌لیتر بافر P حل گردید.

ترانسفورماسیون: به‌منظور تسهیل در انجام ترانسفورماسیون از پلی‌اتیلن‌گلیکول استفاده گردید. ازآنجایی‌که غلظت، وزن مولکولی و زمان مجاورت پروتوپلاست ها با پلی‌اتیلن‌گلیکول حائز اهمیت است پس از بهینه‌سازی‌های متعدد غلظت ۴۰ درصد از پلی‌اتیلن‌گلیکول ۱۰۰۰ به کار رفته و هنگام استفاده ۲/۵ میلی‌لیتر بافر P به آن افزوده گردید. به‌منظور انجام ترانسفورماسیون در صورت استفاده از پروتوپلاست های منجمد، آن‌ها را در بن‌ماری ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده تا سریعاً ذوب شود. نمونه‌ها در rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ گردیده و مایع رویی دور ریخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر از پلی‌اتیلن‌گلیکول ۴۰ درصد و ۲۰ میکرولیتر از نمونه DNA به‌صورت همزمان به نمونه‌ی پروتوپلاست‌ها اضافه گردید. پس از گذشت ۱ دقیقه، ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر P به محلول اضافه شد. نمونه‌ها در rpm ۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد و پروتوپلاست ها در ۱ میلی‌لیتر از بافر P حل شد. به‌منظور بازیابی پروتوپلاست های *استرپتومایسس کلاولی-جروس* از محیط RSM فاقد آنتی‌بیوتیک استفاده گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه روی پلیت RSM کشت داده و پس از حدود ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۶ درجه سلسیوس و بازیابی کامل پروتوپلاست‌ها، پلیت‌ها به‌وسیله ۲/۵ میلی‌لیتر محیط سافت آگار حاوی پادزیست تیواسترپتون با غلظت ۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر پوشانده شدند. انکوباسیون به مدت یک هفته‌ی دیگر در شرایط قبلی ادامه یافت.

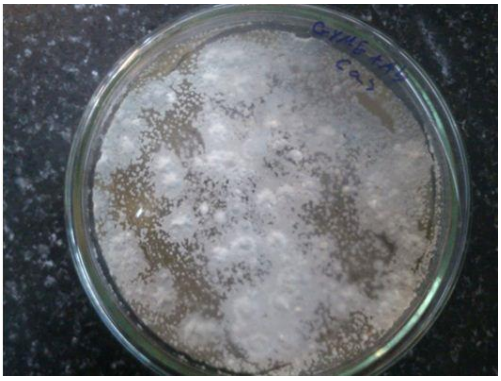
استخراج پلاسمید: به‌منظور استخراج پلاسمید از روش لیز قلیایی که توسط بیرن‌بویم و دالی در سال ۱۹۷۹ ارائه گردید استفاده شد. به این منظور اسپور باکتری در محیط YEME به مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس کشت داده شد. محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و به رسوب حاصله ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ حاوی گلوکز، TrisHCl، EDTA و لیزوزیم اضافه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. در ادامه محلول حاوی SDS و NaOH اضافه و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد. ۳۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم به ترکیب موجود اضافه و مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول فنل /کلروفرم/ایزوآمیل الکل به محلول رویی اضافه‌شده و به مدت ۵ دقیقه در شرایط مرحله قبل سانتریفیوژ شد. فاز آبی رویی برداشته‌شده و ایزوپروپانول سرد به آن اضافه گردیده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصله ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد و پس از گذشت ۵ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی کاملاً تخلیه شد. پس از خشک شدن کامل رسوب، ۲۰۰ میکرولیتر محلول TE حاوی RNase به رسوب اضافه گشت.

روش بیواسی: به‌منظور مشاهده‌ی تأثیر cas2 در بیان کلاولانیک اسید از روش بیواسی استفاده گردید. در این روش نمونه‌های اسپور وحشی و موتانت حاوی وکتور بر روی محیط GYME حاوی پادزیست تیواسترپتون کشت داده می‌شود. به این منظور در ابتدا رقت یکسانی از اسپورها تهیه‌شده و ۳۰ میکرولیتر از استوک باکتری بر روی محیط GYME کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت باکتری *کلبسیلا پنمونیه* (Klebsiella pneumonia) در محیط TSB کشت داده شد. زمانی که OD600 محیط به ۰/۹ تا ۱ رسید، ۳/۳ میلی‌لیتر از محیط حاوی باکتری را با ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط TSA مایع (دمای حدود ۴۷ درجه) و ۱۰۰ میکرولیتر پنی‌سیلین G با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاملاً مخلوط گردید و بلافاصله بر روی پلیس‌های حاوی باکتری ریخته شد. هاله‌ی عدم رشد باکتری‌های *کلبسیلا پنمونیه* پس از ۲۴ ساعت مشاهده گردید.

یافته‌ها

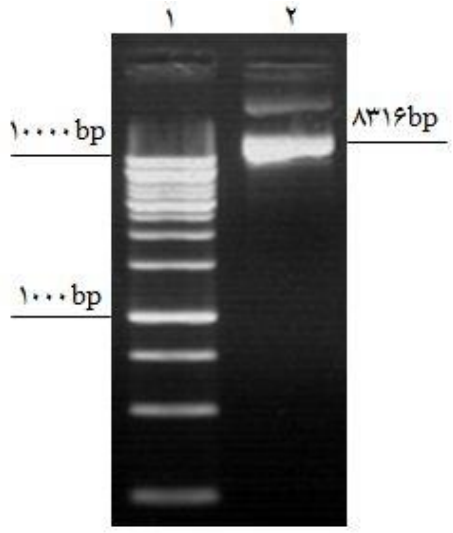
سازه‌ی نوترکیب PMTcas2 حاوی ژن cas2 از دانشگاه اصفهان تهیه گردید. سازه‌ی نوترکیب مورداستفاده، درون باکتری استرپتومایسس ترانسفورم شده لذا به‌منظور استفاده، از سویه‌ی *استرپتومایسس لیویدنس* استخراج گردید و به‌منظور انجام ترانسفورماسیون به سویه‌ی اصلی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* استفاده شد. پلاسمیدهای استخراج گردیده با استفاده از آنزیم‌های BamH1 و XbaI مورد هضم آنزیمی دوگانه قرار گرفت. نتایج حاصل از هضم آنزیمی (جدا شدن ژن cas2 با طول ۱۰۰۸ جفت‌باز) صحت حضور ژن موردنظر را تأیید می‌نماید (داده‌های حاصل از هضم آنزیمی در این مقاله آورده نشده است). به‌منظور تهیه‌ی پروتوپلاست، باکتری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* در محیط YEMEG که حاوی گلیسین و گلیسرول بوده و شرایط را به‌منظور رشد مناسب *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* فراهم آورده،

کشت داده شد و پس از ۷۲ ساعت پروتوپلاست تهیه گردید. با توجه به اینکه پلاسمید PMT3206 حاوی پروموتر Gylp1/p2 بوده حضور گلیسرول به‌عنوان عامل القایی سبب تحریک بیان و افزایش تولید ژن cas2 می‌گردد. پروتوپلاست‌های تهیه‌شده به‌منظور انجام ترانسفورماسیون مورداستفاده قرار گرفت. ترانسفورماسیون سویه‌ی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* با استفاده از PEG انجام‌گرفته و پس از ۷۲ ساعت پادزیست به محیط RSM اضافه و به مدت یک هفته در شرایط مناسب انکوبه شد. کلنی‌های گچی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* بر روی محیط مشاهده گردید و بلافاصله بر روی محیط GYME حاوی پادزیست تایواسترپتون کشت داده شد. کلنی‌ها بر روی محیط رشد کرده و پس از یک هفته اسپورهای خاکستری‌رنگ بر روی آن‌ها تشکیل شد (شکل ۱).



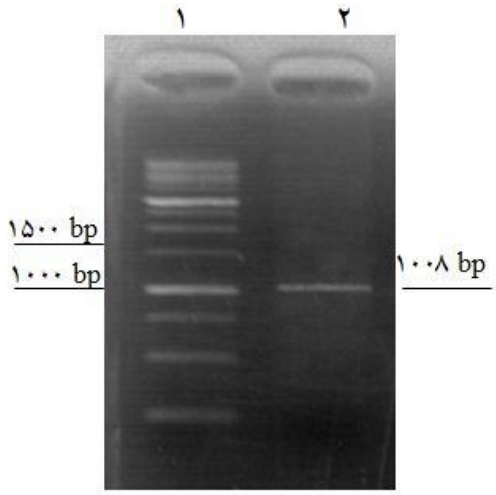
شکل ۱: کلنی‌های گچی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* تراریخت بر روی محیط GYME حاوی آنتی‌بیوتیک که پس از گذشت یک هفته اسپورهای خاکستری‌رنگ بر روی آن‌ها تشکیل‌شده است.

رشد کلنی‌های باکتری در محیط حاوی پادزیست خود نشان از تأیید انجام ترانسفورماسیون داشته لیکن به‌منظور تأیید نهایی فرایند ترانسفورماسیون، استخراج پلاسمید از سویه‌ی ترانسفورم شده صورت گرفت. پلاسمید pMTCas2 استخراج‌شده بر روی ژل ۰/۷٪ آگارز برده شده و باند پلاسمیدی با طول ۸۳۱۶ مشاهده گردید (شکل ۲).



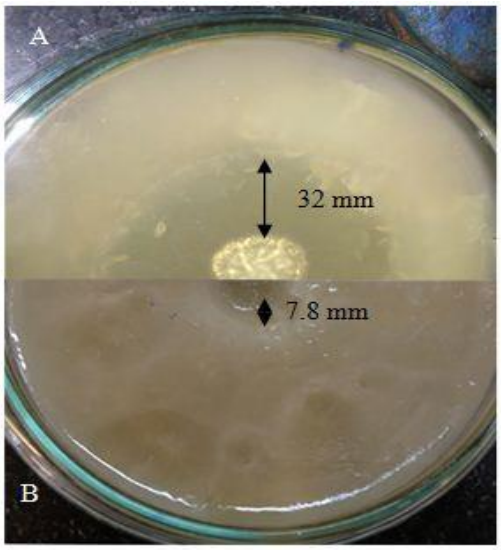
شکل ۲: وکتور pMTcas2 استخراج‌شده از *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* تراریخت ۱(مارکر ۱ kb 2) پلاسمید استخراج‌شده (پلاسمیدهای استخراج‌شده بر روی ژل ۰/۷٪ و حضور ولتاژ ۱۰۰ بارگذاری گردید)

پلاسمید استخراج گردیده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (cas2) 5′ACAGGATCCATGGCCT CTCCGATAG3′ و PCR 5′AGATCTACTAGTTAGCCGGGCTCAGCG3′ گردید تا حضور ژن cas2 درون پلاسمید تأیید شود. محصول PCR بر روی ژل ۱ درصد برده شد و باند ۱۰۰۸ جفت‌بازی مربوط به ژن cas2 مشاهده گردید که تأییدکننده‌ی حضور ژن در پلاسمید استخراج گردیده می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۳: قطعه‌ی تکثیرشده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی cas2. 1(مارکر ۱ kb 2) باند ژن cas2 (قطعه‌ی تکثیرشده بر روی ژل ۱٪ و حضور ولتاژ ۱۰۰ بارگذاری گردید)

به‌منظور بررسی تأثیر سازه‌ی نوترکیب در تولید پادزیست کلاولانیک اسید روش نیمه کمی بیواسی مورداستفاده قرار گرفت. در این روش پس از انجام تست توانایی، میزان برابر اسپور توانمند در هر دو پلیت استفاده شد؛ ولی با توجه به برابر نبودن غلظت هر دو استوک باکتریایی، تفاوت در قطر رشد اولیه باکتری‌ها دیده شد. میزان هاله‌ی عدم رشد در نمونه‌ی کنترل و نمونه‌ی ترانسفورم شده بررسی گردید. با مشاهده‌ی هاله‌ی عدم رشد و مقایسه‌ی آن با نمونه‌ی کنترل مشخص گردید که حضور سازه‌ی نوترکیب در سویه‌ی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* سبب افزایش بیان و تولید پادزیست گردیده است. مطالعات نشان داد که پلاسمید نوترکیب pMTCas2 سبب افزایش ۴/۱ برابری تولید پادزیست کلاولانیک اسید در سویه‌ی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* گردیده است (شکل ۴).



شکل ۴: نمایش افزایش میزان تولید کلاولانیک اسید در سویه‌ی تراریخت A(نمونه‌ی تراریخت B) نمونه‌ی وحشی.

بحث

کلاولانیک اسید از مهارکننده‌های بتالاکتامازها بوده که استفاده‌ی بالینی گسترده‌ای دارد. اگرچه این پادزیست به تنهایی مورداستفاده قرار نگرفته و معمولاً به‌صورت ترکیبی با سایر پادزیست ها مورداستفاده قرار می‌گیرد (۱۳). با توجه به نقشی که این پادزیست در تولید انواع مختلفی از داروها داشته، تولید آن می‌تواند به لحاظ اقتصادی بسیار حائز اهمیت باشد. باید دقت داشت که تولید یک دارو به تنهایی نمی‌تواند ارزش اقتصادی آن را توجیه نماید؛ چراکه بسیاری از داروها با هزینه‌های بسیار زیادی تولیدشده و لذا ازلحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه نمی‌باشند؛ بنابراین در کنار تلاش به‌منظور تولید داروهای مختلف باید راه‌کارهایی در جهت تولید بهینه و اقتصادی آن‌ها پیشنهاد گردد. امروزه با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و دست‌کاری ژنتیکی سویه‌های تولیدکننده‌ی پادزیست‌ها تلاش گسترده‌ای در جهت افزایش راندمان و کاهش هزینه‌های تولیدی صورت پذیرفته است. در این تحقیق تلاش شده تا با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک سویه‌هایی باقابلیت تولید مقادیر بالای این پادزیست تولید گردد. یکی از راه‌های افزایش تولید پادزیست شناسایی ژن‌های درگیر در فرایند تولید و افزایش تعداد کپی آن‌ها در سلول بوده که منجر به افزایش بیان آن می‌گردد. در این تحقیق به‌منظور کلون نمودن ژن cas2 برای اولین بار از وکتور pMT3206 استفاده گردید. این وکتور یک وکتور بیانی چند کپی ویژه‌ی استرپتومایسس بوده که واجد پروموتر القایی gylP1/p2 تحت تنظیم گلیسرول و ژن مهارکننده‌ی GylR می‌باشد. ژن GylR یک رپرسور را ساخته که در صورت فقدان گلیسرول از بیان پروموتر القایی gylP1/P2 ممانعت می‌نماید (۱۴). بدین ترتیب می‌توان با اضافه نمودن گلیسرول میزان بیان ژن cas2 را افزایش داد. دست‌کاری ژنوم استرپتومایسس با استفاده از روش‌های مختلفی مانند کانجوگاسیون، الکتروپوریشن و انتقال پروتوپلاستی به‌واسطه‌ی PEG امکان‌پذیر است (۱۱). مانع اصلی برای ورود DNA بیگانه به استرپتومایسس‌ها وجود سدهای محدودیت اصلاح در برابر پذیرش DNA بیگانه می‌باشد. به‌منظور غلبه بر این مشکل در این تحقیق از سویه‌ی حد واسط *استرپتومایسس لیویدنس* استفاده‌شده است. پلاسمیدهای نوترکیب تهیه‌شده در ابتدا از سویه‌ی *استرپتومایسس لیویدنس* استخراج گردیده که دارای الگوهای متیلاسیون مشابه با سویه‌ی اصلی می‌باشد. در ادامه و پس از ترانسفورماسیون آن با استفاده از PEG به سویه‌ی اصلی، میزان تأثیر ژن cas2 در افزایش بیان کلاولانیک اسید با استفاده از روش بیواسی سنجیده شد. بررسی‌های انجام‌شده نشان داده است که این تغییر سبب افزایش ۴/۱ برابری تولید این پادزیست گردیده است. با توجه به تأثیر تنظیمی گلیسرول پیشنهاد می‌گردد تا با بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری در غلظت‌های مختلف گلیسرول روند تولید پادزیست بهبود یابد. همچنین با ترسیم نمودار استاندارد در غلظت‌های مختلف کلاولانیک اسید میزان کمی تولید پادزیست در روش بیواسی با دقت بیشتری محاسبه گردد. نتایج تحقیق حاضر

می‌تواند به بومی‌سازی تولید پادزیست و کاهش هزینه‌های تولیدی و درنتیجه کاهش قیمت تمام‌شده کمک شایانی نماید.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اصفهان که با حمایت های مالی ما را در اجرای این طرح (طرح مصوب پژوهشی دانشگاه اصفهان ۹۰/۲۵۶۹۵) یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را می نماییم.

References

1. Hopwood DA. Streptomyces in nature and medicine the antibiotic maker. 1rd ed. USA: Oxford University press; 2007.
2. Inoue S, Higashiyama K, Uchida T, Hiratsu K, Kinashi, H. Cromosomal circularization in Streptomyces griseus by nonhomologus recombination of deletion ends. Biosci Biotechnol Biochem. 2003; 67(5): 1101-08.
3. Dyson P. Streptomyces. Encyclopedia of Microbiology. 3rd ed. UK: Swansea University; 2009.
4. Saudagar PS, Survase SA, Singhal RS. Clavulanic acid: A review. Biotechnol Adv. 2008; 26(4): 335-51.
5. Baggaley KH, Brown AG, Schofield CJ. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. Nat Prod Rep. 1997; 14(4): 309-33.
6. Livermore DM. β-lactamase mediated resistance and opportunities for its control. J Antimicrob Chemother. 1998; 41 (suppl 4): 25-41.
7. Santos VC, Pereira JB, Haga RB. Stability of clavulanic acid under variable PH, ionic strength and temperature conditions a new kinetic approach. Biochem eng J. 2004; 45(2): 89-93.
8. Song YJ, Jensen SE, Lee KJ. Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 88(3): 659-69.
9. Marsh EN, Chang MD, Townsend CA. Two Isozymes of Clavaminate Synthase Central to Clavulanic Acid Formation: Cloning and Sequencing of Both Genes from Streptomyces clavuligerus. Biochemistry. 1992; 31(50): 12648-57.
10. Paradkar AS, Jensen SE. Functional Analysis of the Gene Encoding the Clavaminate Synthase 2 Isoenzyme Involved in Clavulanic acid biosynthesis in streptomyces clavuligerus. J Bacteriol. 1995; 177(5): 1307–14.
11. Ha HS, Hwang YI, Choi SU. Application of conjugation using phiC31 att/int system for Actinoplanes teichomyceticus, a producer of teicoplanin. Biotechnol Lett. 2008; 30(7): 1233-38.
12. Kuwano T, Shirataki C, Itoh Y. Comparison between polyethylene glycol and polyethylenimine mediated transformation of aspergillus nidulans. Curr Genet. 2008; 54(2): 95-103.
13. Li R, Townsend CA. Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in Streptomyces clavuligerus. Metab Eng. 2006; 8(3): 240-52.
14. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical Streptomyces genetics. England: The John Innes Centre; 2000.